Iranian Food Science and Technology Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 20, No. 5, Dec.-Jan. 2024, p. 607-620

# Antimicrobial and Antioxidant Effects of Sage Seed Gum Film Incorporated with *Laurus nobilis* Essential Oil Nanoemulsion

**H. Taghvatalab[1], D. Jafarpour[2*]**

1 and 2- M.Sc. Graduated and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Fasa Branch, Islamic Azad University, Fasa, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: Do.Jafarpour@iau.ac.ir)

| | |
|---|---|
| Received: 14.05.2024<br>Revised: 14.06.2024<br>Accepted: 04.07.2024<br>Available Online: 04.07.2024 | **How to cite this article:**<br>Taghvatalab, H., & Jafarpour, D. (2024). Antimicrobial and antioxidant effects of sage seed gum film incorporated with *Laurus nobilis* essential oil nanoemulsion. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 20*(5), 607-620. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj. 2024.88064.1332 |

## Introduction

Scientific evidence is mounting that synthetic chemicals used as food additives may have harmful impacts on health and the biological system and cause many diseases and damages to the human body. Also, many consumers are concerned about the use of artificial ingredients to maintain the quality and safety of foods. Therefore, the use of natural preservatives and food preservation methods based on natural compounds have attracted the attention of researchers. Edible films and coatings are useful materials, mainly produced from biodegradable polymers including polysaccharides (gums), proteins, and lipids, and are commonly used for the shelf life extension of foods. The primary edible films /coatings are promising alternative methods to preserve, and retard the adverse chemical reactions and microbial growth. They also can act as a carrier of antimicrobials, antioxidant substances, and other additives. Sage seed gum (SSG) is a water-soluble polysaccharide obtained from Sage (*Salvia macrosiphon*). It is an environmentally-friendly biodegradable material that can form high-viscosity aqueous solution and exhibit pseudoplastic behavior. Essential oils (EOs) are volatile and aromatic oily liquids extracted from various plants. Most of the EOs have antimicrobial and antioxidant activities due to their phenolic compounds, terpenes and terpenoids. A promising technique is incorporating EOs into coating solutions as active film/coating to extend the shelf life of food products. Bay leaf (*Laurus nobilis*) is an aromatic evergreen tree or large shrub with green, glabrous leaves. It is used as a flavoring agent and an essential ingredient in food preparation. Bay leaf has received much attention due to its antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and immune system stimulating properties. Hence, the aim of the present study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant properties of SSG coating incorporated with different concentrations of bay leaf EO (BLEO) and its nanoemulsion (BLNEO).

## Materials and Methods

The active packaging was produced based on the gum of sage seed containing BLEO and BLNEO. After preparing the EO from bay leaves, their corresponding NEO was produced and the characterization of nanoparticles was evaluated in terms of droplet size, polydispersity index (PDI) and zeta potentials. Then, the antimicrobial and antioxidant properties of BLEO and BLNEO were compared. After that, SSG coatings were prepared with 1.5% and 3% BLEO and their corresponding NEO forms. Subsequently, the antioxidant (DPPH and ABTS) and antimicrobial (against *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*) properties of the produced films were investigated.

## Results and Discussion

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) identified 1,8-Cineole and α- Terpinyl acetate as the major components of BLEO. The BLNEO exhibited a droplet size of approximately 92.4 nm and a zeta potential


https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.88064.1332

of -45.1 mV. In comparison to the control and SSG, it was found that the group comprising EO and NEO significantly ($p<0.05$) showed superior free radical scavenging capacity. SSG-3% BLNEO had the highest DPPH inhibition percentage (69.54%). According to the results, EO at the nanoscale can scavenge more free radicals than EO ($p<0.05$). Antimicrobial inhibition zone of different treatments against selected gram positive and gram negative bacteria showed that all bacteria were strongly inhibited after the addition of BLEO into the SSG. Moreover, data revealed that the growth of the studied pathogens was completely inhibited in a dose-dependent manner ($p<0.05$). SSG-BLNEO exhibited better antimicrobial activity than SSG-BLEO coating and its antimicrobial activity was significantly enhanced by increasing BLNEO concentration ($p<0.05$). This phenomenon is attributed to the protective role of encapsulation and the slow release of EO from the coating matrix, resulting in enhanced antimicrobial activity. Nanoemulsions, owing to their small droplet size and high surface area, offer superior efficacy compared to conventional emulsions. Consequently, the gradual release of essential oils from nanoemulsion-based edible coatings contributes to their enhanced antimicrobial performance.

## Conclusion

These findings suggest that the SSG-BLNEO edible active coating possesses promising applications as an antimicrobial and antioxidant agent for food packaging applications.

**Keywords:** Antioxidant properties, Bay leaf essential oil, Nanoemulsion, Sage seed gum

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۲۰، شماره ۵، آذر-دی ۱۴۰۳، ص. ۶۰۷-۶۲۰

# ارزیابی اثرات ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی فیلم تهیه شده از صمغ دانه مرو حاوی نانوامولسیون اسانس برگ بو (*Laurus nobilis*)

حدیث تقواطلب[۱]- درنوش جعفرپور[۲*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۴

## چکیده

در سال‌های اخیر افزودن نگهدارنده‌های شیمیایی باعث ایجاد بیماری‌های بسیاری شده است. همچنین بسیاری از مصرف‌کنندگان نگران استفاده از مواد مصنوعی برای حفظ کیفیت و ایمنی غذا هستند. از این رو، این مطالعه با هدف تولید یک نوع فیلم فعال بر پایه صمغ دانه مرو حاوی اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو انجام شد. پس از تهیه اسانس برگ بو، نانوامولسیون آن تولید و از نظر اندازه و توزیع ذرات بررسی شد. به فیلم صمغ دانه مرو، اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو در غلظت‌های ۱/۵ و ۳ درصد افزوده و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی فیلم‌های تولیدی مورد بررسی قرار گرفتند. متوسط قطر ذرات نانوامولسیون اسانس ۹۲/۴ نانومتر و پتانسیل زتا ۴۵/۱- میلی‌ولت بدست آمد. نتایج نشان داد که فیلم حاوی نانوامولسیون اسانس در مهار رشد باکتریایی مؤثرتر از فیلم حاوی اسانس بود و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان حساس‌ترین باکتری و *اشریشیاکلی* به‌عنوان مقاوم‌ترین باکتری شناسایی گردید. فیلم حاوی اسانس و نانوامولسیون اسانس ویژگی‌های آنتی اکسیدانی خوبی را نسبت به نمونه شاهد ($P<0/05$) نشان دادند به‌طوری‌که فیلم حاوی ۳٪ نانوامولسیون اسانس، بالاترین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد داشت. نتایج این مطالعه تأیید کرد که فیلم‌های تهیه شده از صمغ دانه مرو حاوی اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو می‌توانند به‌طور بالقوه به‌عنوان بسته‌بندی فعال با خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرند.

**واژه‌های کلیدی:** اسانس برگ بو، خواص آنتی‌اکسیدانی، صمغ دانه مرو، نانوامولسیون

## مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان نگران استفاده از ترکیبات مصنوعی به عنوان افزودنی برای حفظ محصولات غذایی هستند. علاوه بر این، صنایع غذایی از محصولات طبیعی دارای فعالیت ضدمیکروبی به منظور حفظ کیفیت مواد غذایی بدون تأثیر بر مصرف‌کنندگان استقبال می‌کند (da Silva Dannenberg *et al.*, 2017). فیلم‌های خوراکی مانند اسانس که حاوی ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی هستند، به‌عنوان بسته‌بندی عالی برای نگهداری مواد غذایی در نظر گرفته می‌شوند. امروزه به‌دلیل تجزیه‌ناپذیری مواد بسته‌بندی مصنوعی، تمایل محققان به منابع طبیعی برای تولید فیلم‌های خوراکی افزایش یافته است (Jouki *et al.*, 2013). امروز فیلم‌های زیست‌تخریب پذیر از پروتئین‌ها، لیپیدها و پلی‌ساکاریدها و یا ترکیبی از آن‌ها تهیه می‌شود.

صمغ حاصل از دانه مرو، یک صمغ آنیونی از نوع گالاکتومانان (نسبت مانوز به گالاکتوز ۱: ۱/۹۸- ۱/۷۸)، با وزن مولکولی متوسط (۴۰۰ کیلو دالتون) و پیکره سفت میله‌مانند است و حاوی ۲۸/۲-۳۲/۲ ٪ اسید ارونیک بوده که بیانگر ماهیت پلی‌الکترولیتی آن می‌باشد. این صمغ یک پلی‌ساکارید محلول در آب بوده که از دانه‌های گیاه مرو متعلق به جنس *Salvia macrosiphon* و خانواده Labiatae بدست آمده و به‌عنوان فیلم خوراکی استفاده می‌شود. بالا بودن ویسکوزیته، تنش تسلیم و رفتار شدیدا سودوپلاستیک صمغ دانه مرو در غلظت‌ها و دماهای مختلف، نشان می‌دهد که این صمغ جدید ویژگی‌های کاری خوبی را به‌عنوان یک پایدارکننده، غلیظ‌کننده، پیونددهنده و ژلی‌کننده، در سیستم‌های غذایی، دارویی و آرایشی بهداشتی بدست می‌دهد (Mu *et al.*, 2012). این دانه به‌دلیل تولید موسیلاژ فراوان،

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد فسا، دانشگاه آزاد اسلامی، فسا، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Do.Jafarpour@iau.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.88064.1332

در فرمول چهار تخمه که جهت برطرف کردن خارش‌های گلو و سرفه استفاده می‌شود کاربرد سنتی دارد (Mirzai & Mohammadi Sani, 2017).

گیاهان تیره برگ بو به‌صورت درخت یا درختچه بوده و مخصوص نواحی گرم کره زمین هستند. برگ بو معمولاً در نواحی گرم و مناطقی با اقلیم گرم و بارندگی زیاد یافت می‌شود. گیاهان این تیره دارای سلول‌های اسانس‌دار پراکنده در اعضای مختلف و سلول‌های موسیلاژدار، مخصوصاً در ناحیه پوست هستند. از نظر درمانی خواص عده‌ای از این گیاهان مربوط به وجود اسانس‌ها در بخش‌های مختلف آن‌ها می‌باشد. برگ بو جز گیاهان معطر و دارویی می‌باشد و اسانس موجود در برگ‌های آن دارای خواص ضدمیکروبی و ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. امروزه از برگ بو علاوه بر چاشنی غذا و ماده معطر در صنعت داروسازی و فرمولاسیون دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد (Naderi Hagibaghercandi *et al*., 2009). از جمله ترکیبات طبیعی که بعنوان نگهدارنده درمواد غذایی بکار می‌روند، می توان به اسانس‌های گیاهی اشاره کرد. به دلیل وجود ترکیبات فنلی، ترپن‌ها و ترپنوئیدها، بسیاری از اسانس‌ها خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهند (Gholamhosseinpour *et al*., 2023). یکی از زمینه‌های کاربرد نانو در صنایع غذایی درونپوشانی کردن ترکیبات حساس به شرایط محیطی و یا ترکیبات فرار از جمله اسانس‌های گیاهی می‌باشد. نانوامولسیون‌ها را می‌توان به‌عنوان امولسیون‌های روغن در آب (O/W) تعریف کرد که از نظر ترمودینامیکی پایدار و بر خلاف میکروامولسیون‌ها از نظر جنبشی پایدار هستند و تشکیل آن‌ها به انرژی مکانیکی شدید نیاز دارد. معمولاً اندازه متوسط قطرات بین ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر است (Stubenrauch, 2009). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که اندازه ذرات لیپیدی کوچک در نانوامولسیون‌ها خواص فیزیکوشیمیایی لایه‌ها را افزایش می‌دهد و ممکن است فعالیت بیولوژیکی ترکیبات چربی دوست را بهبود بخشد (Galus & Kadzi nska, 2015; Badr *et al*., 2021). نانوامولسیون‌ها به‌دلیل اندازه قطرات کوچکشان از نظر نوری شفاف یا نیمه شفاف هستند و پایداری ترمودینامیکی بالایی در برابر رسوب و تجمع نشان می‌دهند. ذرات نانوامولسیون از نظر ترمودینامیکی به سمت ارگانیسم‌هایی که ساختار لیپیدی در غشاهای خود دارند رانده می‌شوند و این اتصال با گرانش الکترواستاتیکی بین بارهای کاتیونی ذرات نانوامولسیون و بارهای آنیونی غشای بیرونی میکروارگانیسم‌ها بهبود می‌یابد. هنگامی که نانوامولسیون به پاتوژن متصل می‌شود، انرژی آن آزاد می‌شود. بنابراین غشای لیپیدی پاتوژن ناپایدار شده و باعث هضم و مرگ سلولی می‌شود. این یکی از مکانیسم‌های ضدمیکروبی اصلی نانوامولسیون‌ها است (Azizkhani *et al*., 2021).

مرور پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که اسانس برگ بو علی رغم اثر ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی مطلوب تاکنون در فیلم فعال حاصل از صمغ دانه مرو بکار نرفته است، از این رو در این پژوهش علاوه بر بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو، تأثیر آن‌ها در فیلم‌های تولیدی نیز بررسی خواهد شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه برگ بو

گیاه برگ بو بصورت خشک از یکی از عطاری‌های معتبر شهرستان فسا خریداری شد.

### اسانس‌گیری

جهت تهیه اسانس، ۶۰ گرم از برگ بوی آسیاب شده، در یک بالن یک لیتری قرار داده شد. ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به بالن اضافه و به دستگاه کلونجر متصل شد. تقطیر به‌مدت ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه انجام شد. بازده اسانس تولیدی ۱/۶ درصد بدست آمد (بدین طریق که به ازای هر ۶۰ گرم برگ بو آسیاب شده، ۱c اسانس گرفته شد).

### شناسایی ترکیبات اسانس

به‌منظور شناسایی ترکیب‌های اسانس، از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS[1]) استفاده شد. این دستگاه مجهز به ستون موئینه DB-5 ms EVDX (۶۰ mm × ۰/۳۲۰ mm) و همچنین دتکتور Hewlett- Packard ۵۹۷۳ بود. برنامه-ریزی حرارتی ستون به شرح زیر بود: گاز حامل با سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه، سرعت تزریق یک میکرولیتر و نسبت شکاف نمونه ۱ به ۲۰، دمای اولیه ۱۰۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه، اولین افزایش دما تا ۱۳۰ درجه سلسیوس با گرادیان دمایی ۱۰ درجه سلسیوس بر دقیقه، دومین افزایش دما تا ۲۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه تنظیم شد(Sajjadi *et al*., 2020) .

### تهیه نانوامولسیون اسانس

تهیه نانوامولسیون اسانس برگ بو طبق روش خودری و رومیانی (Khodri & Romiani, 2019)، با کمی تغییرات انجام شد. برای آماده‌سازی نانوامولسیون از آب مقطر، ۲ در صد اسانس برگ بو و ۲ درصد امولسیفایر توئین ۸۰ به‌عنوان سورفکتانت استفاده گردید. به این ترتیب که ترکیب هر سه با استفاده از همزن مگنت‌دار با ۸۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۴۰ دقیقه انجام شد. محلول تهیه شده در دمای اتاق نگهداری شد.

1- Gas Chromatograph/Mass Spectrometer

### ارزیابی توزیع اندازه ذرات

ابزار پراکندگی دینامیکی نور (DLS) برای تعیین شدت میانگین اندازه قطرات در ۲۵ درجه سلسیوس و زاویه پراکندگی ۹۰ درجه استفاده شد. span (عرض توزیع) با استفاده از رابطه (۱) تعیین شد:

$$\text{Span} = (d90 - d10)/d50 \quad (۱)$$

که در آن $d10$، $d50$ و $d90$ اندازه ذرات مربوط به شدت ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد در منحنی توزیع اندازه ذرات تجمعی نسبی هستند (Gahruie *et al.*, 2017).

### ارزیابی اثرات ضدمیکروبی اسانس و نانوامولسیون اسانس

#### ارزیابی خصوصیت ضدباکتریایی اسانس و نانوامولسیون اسانس به روش انتشار چاهک

برای تجزیه و تحلیل فعالیت ضدمیکروبی اثرات اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو، از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلای* و *سودوموناس آئروژینوزا* و به روش انتشار چاهک انجام شد. باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی فوق مهم‌ترین باکتری‌هایی هستند که باعث مسمومیت و فساد مواد غذایی می‌شوند. به‌منظور تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری چند کلونی با محیط‌کشت نوترینت براث کشت داده شد. سوسپانسیون باکتری معادل استاندارد نیم مک فارلند در محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه و بعد از رقت‌سازی مقدار ($۱۰^۶$ CFU $mL^{-1}$) از سوسپانسیون باکتری تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده ($۱۰^۶$ CFU mL-1) در سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار منتقل و با سواپ استریل کشت داده شد. پس از ایجاد چاهک، ۶۰ میکرولیتر از محلول حاوی اسانس یا نانوامولسیون اسانس برگ بو به‌صورت کاملا استریل به چاهک‌ها انتقال داده و پلیت‌های حاوی آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی این مدت کشت‌های باکتریایی از نظر تشکیل شدن یا تشکیل نشدن هاله عدم رشد، بررسی و قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر توسط کولیس اندازه‌گیری شد (Jafarpour *et al.*, 2021b).

### حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس و نانوامولسیون اسانس

فعالیت ضدباکتریایی اسانس برگ بو و نانوامولسیون آن، با تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC[1]) و حداقل غلظت باکتری‌کش (MBC[2]) از میکرودایلوشن با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استریل انجام شد. نمونه‌های باکتری ۲۴ ساعت پیش از انجام آزمایش، در محیط کشت BHT[3] براث کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. محلول اصلی اسانس یا نانوامولسیون اسانس با رقت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توسط دی متیل سولفوکساید تهیه شد. ابتدا در هر چاهک میکروپلیت ۱۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت BHT براث ریخته شد. سپس در ۹ چاهک اسانس و نانوامولسیون اسانس را رقیق‌سازی انجام شد. به چاهک شاهد باکتری اسانس یا نانوامولسیون اسانس اضافه نشد. پس از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های مورد نظر آماده شده رقت $۱۰^۶$ cfu $ml^{-1}$ تهیه شد و در تمامی چاهک‌ها به جز شاهد اسانس یا نانوامولسیون اسانس، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ریخته شد. پس از طی زمان انکوباسیون چاهک‌ها از نظر کدورت و رشد باکتری بررسی شدند. کمترین رقت اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو که در آن کدورت مشاهده نشد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو از چاهک‌هایی که در آن‌ها عدم رشد مشاهده شده بود، ۵ میکرولیتر برداشته در سطح محیط کشت BHT آگار کشت داده شد. محیط‌های کشت تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پلیت مربوط به چاهکی که حاوی کمترین غلظت اسانس یا نانوامولسیون اسانس بود که در آن رشد باکتری مشاهده نگردید به عنوان MBC اسانس یا نانوامولسیون اسانس در نظر گرفته شد.

### ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس و نانوامولسیون اسانس

#### فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت مهار رادیکال اسانس برگ بو و نانوامولسیون با استفاده از DPPH (2,20-diphenyl-1-picrylhydrazyl) به‌عنوان یک رادیکال چربی دوست آزاد پایدار ارزیابی شد. محلول DPPH (۰/۱ میلی‌مولار) در متانول ۹۵ درصد تهیه و ۱ میلی‌لیتر از این محلول به ۰/۳ میلی‌لیتر اسانس برگ بو و نانوامولسیون در غلظت‌های مختلف (در ۱۰- ۰/۰۵ µg $mL^{-1}$) اضافه شد و مخلوط در تاریکی نگهداری شد. در دمای محیط به‌مدت ۲ ساعت جذب (A) در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-vis، اندازه‌گیری شد (S2150-Unico, USA). نمونه بدون اسانس برگ بو یا نانوامولسیون به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. اسید گالیک به‌عنوان استاندارد در نظر گرفته و IC50 محاسبه شد. IC50 یا غلظت نیمه حداکثر بازدارنده به‌عنوان غلظت ترکیبی تعریف شد که می‌تواند ۵۰٪

1- Minimum Inihibitory Concentration

2- Minimum Bactericidal Concentration

3- Butylated hydroxytoluene

از رادیکال های آزاد DPPH را در روش مهار رادیکال آزاد DPPH حذف کند. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Jafarpour, 2022) (۲):

$$\text{Antioxidant activity}= [(A_{control} - A_{sample})/ A_{control}] \times 100 \quad (۲)$$

## سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی کاهش دهنده آهن (FRAP)

پتانسیل کاهش آهن با استفاده از روش بنزی و استرین (Benzie & Strain, 1996) اندازه‌گیری شد. محلول استوک معرف FRAP تازه تهیه شد، برای آماده‌سازی معرف ۰/۳ میلی‌مولار بافر استات (pH ۳/۶)، ۲۰ میلی‌مولار $FeCl_3$ در آب و ۱۰ میلی‌مولار ۲،۴،۶ (تری پیریدیل) -۱،۳،۵-تریازین (TPTZ) محلول در ۴۰ mM HCl به نسبت ۱۰:۱:۱تهیه شد. سپس ۹۰۰ لیتر از این محلول تا دمای ۳۷ درجه سلسیوس حرارت داده و به ۱۰۰ لیتر اسانس برگ بو و نانوامولسیون در غلظت‌های مختلف (۰/۲ – ۱۰ $\mu g\ mL^{-1}$) اضافه شد. جذب پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت شد. کاهش کمپلکس تری پیریدیل تریازین آهن ($Fe^{3+}$ TPTZ) به آهنی($Fe^{2+}$) منجر به رنگ آبی شدید شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از $FeSO_4$ در محدوده غلظت ۱۰۰-۱۰۰۰ µM رسم شد. آزمایش در سه تکرار صورت پذیرفت و FRAP بر اساس معادله ۳ محاسبه شد (Azizkhani *et al.*, 2021):

$$\text{FRAP}= (\Delta A_{sample} / \Delta A_{standard}) \times \text{FRAP valu of ftandard } (\mu M) \quad (۳)$$

## آماده‌سازی فیلم

تهیه فیلم صمغ دانه مرو طبق روش ونت نیمیت کول و همکاران (Wongnimitkul *et al.*, 2009) با کمی تغییرات انجام شد. این فیلم با ترکیب پودر صمغ دانه مرو، KOH 0/5M و گلیسرول به ترتیب با مقدار ۰/۹، ۰/۱۴ و ۰/۵٪ تهیه شد. امولسیون به‌مدت ۲ ساعت در حمام آب کنترل شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به خوبی هم زده شد. سپس، غلظت‌های ۱/۵ و ۳٪ اسانس برگ بو و نانوامولسیون اسانس برگ بو به فیلم اضافه شد.

## ارزیابی اثرات ضدمیکروبی فیلم

فعالیت ضدمیکروبی نمونه‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک آگار و بر علیه *اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس* ارزیابی شد. نمونه‌های فیلم به صورت آسپتیک به دیسک‌های دایره‌ای (قطر ۶ میلی‌متر) بریده شدند. سپس روی صفحات MHA[1] که قبلاً با ۱۰۰ میکرولیتر MHB[2] حاوی ۱۰$^6$CFU ml$^{-1}$ باکتری آزمایشی تلقیح شده بودند قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر مناطق بازدارنده توسط کولیس با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر تعیین شد (Mohammadi *et al.*, 2023).

## ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی فیلم

### آزمون DPPH

به‌طور خلاصه، ۲۵ میلی‌گرم از نمونه فیلم با هم زدن مداوم در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول مذکور با ۳/۹ میلی‌لیتر محلول متانول DPPH (۰/۱ میلی‌مولار) مخلوط شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای محیط در تاریکی نگهداری شده و سپس جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در برابر محلول متانول DPPH به‌صورت خالی قرائت شد (Jafarpour *et al.*, 2021).

### روش رادیکال کاتیون ABTS

روش رادیکال کاتیون ABTS بر مبنای احیای رادیکال کاتیون ABTS بوده که جذب بالایی در ۷۳۴ نانومتر دارد. ابتدا محلول‌های پایه شامل ABTS و پتاسیم پرسولفات تهیه شد و در ادامه محلول اصلی ABTS به‌وسیله مخلوط کردن دو محلول پایه به مقدار مساوی با یکدیگر، تهیه شده، در ادامه این مخلوط در دمای اتاق و محیط تاریک به‌مدت ۱۶ ساعت به‌منظور تکمیل واکنش نگهداری شد. محلول تهیه شده برای رسیدن جذب نوری به ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر با اتانول رقیق شد. به ۲ میلی‌لیتر از غلظت‌های ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس، عصاره و BHT اضافه شد و بعد از نگهداری به‌مدت ۶ دقیقه در تاریکی، جذب نوری نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی نمونه‌ها را از رابطه ۴ محاسبه و به‌صورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل اسید آسکوربیک گزارش شد (Alizadeh Amoli *et al.*, 2021):

$$x\% = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \times 100 \quad (۴)$$

در این فرمول Ablank میزان جذب نوری کنترل را نشان می دهد و Asample بیانگر قدرت جذب نوری غلظت‌های مختلف اسانس و نانوامولسون گیاه است.

## آنالیز آماری

آزمایشات در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج ابتدا در معرض تجزیه واریانس یکطرفه قرار گرفت و سپس برای مقایسه میانگین‌ها و بررسی اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۹۵٪ استفاده گردد.

1- Mueller-Hinton agar

2- Mueller Hinton Broth

تجزیه و تحلیل آماری داده ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. منحنی‌های مربوطه در محیط EXCEL توسط نرم افزار OFFICE رسم شد.

## نتایج و بحث

### شناسایی ترکیب‌های اسانس

محتویات اسانس گیاه برگ بو *Laurus nobilis* به‌دست‌آمده از تقطیر با آب، که در دستگاه GC/MS بررسی شد در جدول ۱ گزارش شده است.

با توجه به جدول ۱ بیشترین مقدار ترکیب 1,8-Cineole و α-Terpinyl acetate می‌باشد. از این ترکیبات به‌عنوان چاشنی، مواد معطر و خوشبو کننده مواد غذایی و در صنایع شیرینی‌پزی، تولیدات گوشت و همچنین صنعت دارویی در مقادیر کم استفاده می شود. از جمله کاربردهای دارویی آن‌ها می‌توان به فرو نشاندن سرفه در مبتلایان به آسم، درمان عفونت‌های حنجره، کاهنده التهاب و درد در صورت استفاده صحیح و از بین برنده سلول‌های سرطان و از بین برنده و دافع حشرات اشاره کرد (Naderi Hagibaghercandi *et al.*, 2009).

### ارزیابی توزیع اندازه ذرات (متوسط قطر، توزیع اندازه ذرات)

متوسط قطر اندازه ذرات نانوامولسیون و PDI و پتانسیل زتا آن‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اندازه قطرات نانوامولسیون ۹۲/۴ نانومتر است و پتانسیل زتای آن ۴۵/۱- می‌باشد، همچنین نانوامولسیون‌های روغن برگ بو دارای پایداری فیزیکی بالایی هستند. نتایج مشابه‌ای توسط قوش و همکاران (Ghosh *et al.*, 2013) برای نانوامولسیون روغن ریحان فرموله شده با استفاده از Tween80 و آب به روش امولسیون اولتراسونیک گزارش شده است. در حالی‌که سورینو و همکاران (Severino *et al.*, 2015) نانوامولسیون‌های بارگذاری شده را با استفاده از Tween 20 تهیه کرده و میانگین اندازه قطرات را در محدوده ۱۷۶/۴- ۱۳۳/۴ نانومتر گزارش کردند. این تفاوت‌ها با نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که Tween 80 برای امولسیون‌های روغن در آب به‌دلیل تعادل آبدوست–چربی دوست بالاتر نسبت به سایر پلی سوربات‌ها مطلوب است (Ghosh *et al.*, 2013). می‌توان نتیجه گرفت که Tween 80 به‌عنوان یک سورفکتانت نسبت به پلیمرهای زیستی جذب آب بیشتر و کمک بیشتری در به حداقل رساندن اندازه ذرات انجام می‌دهد (Qian, & McClement, 2011).

**جدول ۱- ترکیبات اسانس برگ بو**

**Table 1- Compositions of essential oil of bay leaves**

| شماره<br>Compound number | زمان نگهداری<br>Retention Time (min) | نام ترکیب شیمیایی<br>Name of chemical compound | ناحیه<br>Area % | وزن مول<br>Mol Weight (amu) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 5.663 | α –Pinene | 2.617 | 136.125 |
| 2 | 6.619 | Sabinene | 5.197 | 136.125 |
| 3 | 6.776 | β – pinene | 2.006 | 136.125 |
| 4 | 8.309 | 1,8-Cineole | 32.309 | 154.136 |
| 5 | 10.087 | LINALOOL L | 4.808 | 154.136 |
| 6 | 12.483 | L-4-terpineneol | 2.083 | 154.136 |
| 7 | 12.955 | α – TERPINEOL | 2.826 | 154.136 |
| 8 | 15.974 | δ -terpinyl acetate | 2.295 | 198.162 |
| 9 | 17.058 | α- Terpinyl acetate | 28.061 | 196.146 |
| 10 | 17.338 | Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)- | 2.845 | 164.084 |
| 11 | 17.991 | β – ELEMENE | 1.884 | 204.188 |
| 12 | 18.504 | Methyleugenol | 4.919 | 178.099 |
| 13 | 18.859 | Caryophyllene | 2.199 | 204.188 |
| 14 | 5.663 | cis-α-Bisabolene | 0.957 | 204.188 |
| 15 | 6.619 | Caryophyllene oxide | 2.487 | 220.183 |
| 16 | 6.776 | 7.beta.-(1-hydroxy-1-methylethyl)-4a.beta.-methyl-1a.beta.-decahydrocyclopropa[d]naphthalene | 2.507 | 222.198 |

جدول ۲- خواص فیزیکی نانوامولسیون اسانس برگ بو

Table 2- Physical properties of bay leaf essential oil nanoemulsion

| اندازه<br>Parameter | |
|---|---|
| اندازه ذرات<br>Particle size (nm) | 92.4 |
| پتانسیل زتا<br>Z-average (mV) | -45.1 |
| PDI | 0.1 |

مقدار PDI از ۰/۱ تا ۰/۲۵ نشان‌دهنده اندازه قطرات روغن یکنواخت یا توزیع تک وجهی و حالت امولسیونی پایدارتر است. در این مطالعه، استفاده از اولتراسوند منجر به مقدار PDI برابر با ۰/۱ شد که نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن تولید نانوامولسیون است.

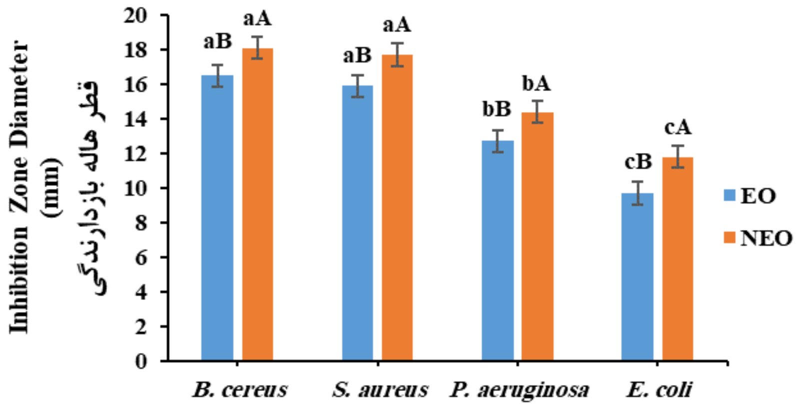
پتانسیل زتا بار سطحی را در سطح مشترک قطرات تعیین می‌کند. نانوامولسیون‌های تهیه شده در این مطالعه حاوی یک سورفکتانت غیر یونی (Tween 80) بود. پس می‌توان انتظار داشت که بار الکتریکی نزدیک به صفر باشد. با این حال، یک پتانسیل زتا منفی برای هر دوی آن‌ها ثبت شد. اگر مقدار مطلق پتانسیل زتا بین ۳۰ تا ۶۰ میلی ولت باشد، سیستم نانوامولسیون پایدار است (Haghju *et al*., 2016). مقادیر پتانسیل زتا نانوامولسیون‌ها در مطالعه حاضر پایدار (۵۶ میلی ولت) بدست آمد. بنابراین دافعه الکترواستاتیکی در بین قطرات برای تثبیت نانوامولسیون تهیه شده کافی است و مکانیسم‌های الکترواستاتیک تأثیر قابل توجه‌ای بر تثبیت آن دارند. تمامی تحقیقاتی که نانوامولسیون‌های اسانس تثبیت شده توسط پلیمرهای زیستی را تولید کردند، مقادیر پتانسیل زتای مشابه را در مقایسه با نتایج این تحقیق گزارش کردند.

## ارزیابی اثرات ضدمیکروبی

همانطور که در جدول ۳ و شکل ۱ نشان داده شده است، اثرات ضدمیکروبی نانوامولسیون نسبت به اسانس برگ بو به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) بیشتر بود و منجر به کاهش معنی‌دار رشد باکتری‌های *B. cereus*، *S. aureus*، *P. aeruginosa* و *E. coli* شد. این کاهش تابعی از غلظت اسانس در نانوامولسیون بود. با توجه به نتایج، باکتری-های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی نسبت به اسانس یا نانوامولسیون اسانس برگ بو حساس‌تر هستند. نتایج نشان داد نانوامولسیون اسانس برگ بو، بیشترین میزان اثرگذاری بر روی باکتری‌های *B. cereus* و *S. aureus* می‌باشد. یکی از علت‌های موجود بر خاصیت ضدمیکروبی اسانس و نانوامولسیون اسانس، وجود ترکیبات 1,8-Cineole و Terpinyl acetate -α می‌باشد (Maghsoodlou *et al*., 2015).

نتایج MIC و MBC اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو در جدول ۳ نشان داده شده است. اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو از حداقل غلظت بازدارنده رشد و حداقل غلظت کشندگی متفاوتی برخوردار هستند. به‌طوری‌که کمترین مقدار MIC و MBC برای اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو مربوط به باکتری *B. cereus* بود. بیشترین مقدار MIC و MBC برای اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو مربوط به باکتری *E. coli* بود. آزمایش انجام شده در این آزمایش (MIC و MBC) نشان می‌دهد که نانوامولسیون تهیه شده خاصیت ضدمیکروبی بیشتری نسبت به اسانس برگ بو دارد. میزان مهار اسانس نانوامولسیون شده در برابر باکتری *E. coli* نیز به طور قابل توجهی بیشتر از اسانس خالص بود. این فعالیت با افزایش غلظت نانوامولسیون اسانس برگ بو به‌طور قابل توجهی افزایش می یابد. این پدیده را می‌توان به اثرات ترکیبی کپسولاسیون و انتشار پایدار اسانس از پوشش ماتریس نسبت داد که منجر به اثربخشی ضدمیکروبی قوی می‌شود. نانوامولسیون‌ها، به‌دلیل اندازه قطرات کوچک و مساحت سطح بالا، کارایی بالاتری نسبت به اسانس‌های معمولی دارند. در نتیجه، آزادسازی تدریجی اسانس‌ها از پوشش‌های خوراکی مبتنی بر نانوامولسیون به بهبود عملکرد ضدمیکروبی آن‌ها کمک می‌کند (Gholamhosseinpour *et al*., 2023).

فعالیت ضدمیکروبی اسانس برگ بو می‌تواند به علت وجود ترکیبات فنلی، مانند فلاونوئیدها باشد. وجود این ترکیبات را می توان توسط آنالیز GC-MS و آزمون‌های ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نشان داد. ترکیبات فنلی ساختار غشای میکروبی را تخریب، سنتز پپتیدوگلیکان را مهار و آبگریزی سطح غشا باکتریایی را اصلاح می نمایند (Gholamhosseinpour *et al*., 2023). در بررسی لو و همکاران (Lu *et al*., 2017) نشان دادند که اسانس خالص و اسانس نانوامولسیون شده تأثیر زیادی بر روی رشد باکتری‌ها دارد.




**شکل ۱- ارزیابی اثرات ضدمیکروبی اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو**

**Fig. 1. Evaluation of antimicrobial effects of essential oil and nanoemulsion of bay leaf essential oil**

حروف کوچک لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین باکتری‌های مختلف در هر تیمار است. حروف بزرگ لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین دو تیمار است.

Different small Latin letters indicate significant differences (P<0.05) between different bacteria in each treatment. Different capital letters indicate significant differences (P<0.05) between two treatments.

**جدول۳- ارزیابی اثرات ضدمیکروبی اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو**

**Table 3- Evaluation of antimicrobial effects of essential oil and nanoemulsion of bay leaf essential oil**

| | *B. cereus* | *S. aureus* | *P. aeruginosa* | *E. coli* |
|---|---|---|---|---|
| EO | | | | |
| MIC (µg mL$^{-1}$) | 4.25±0.10$^{bD}$ | 4.75±0.10$^{bC}$ | 6.75±0.25$^{bB}$ | 7.25±0.20$^{bA}$ |
| MBC (µg mL$^{-1}$) | 5.00±0.18$^{aD}$ | 5.50±0.30$^{aC}$ | 7.25±0.20$^{aB}$ | 8.00±0.15$^{aA}$ |
| NEO | | | | |
| MIC (µg mL$^{-1}$) | 2.50±0.09$^{dD}$ | 3.25±0.09$^{dC}$ | 4.75±0.10$^{dB}$ | 5.75±0.25$^{dA}$ |
| MBC (µg mL$^{-1}$) | 3.25±0.20$^{cD}$ | 3.75±0.14$^{cC}$ | 5.75±0.25$^{cB}$ | 6.25±0.15$^{cA}$ |

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند.

حروف لاتین کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

حروف لاتین بزرگ متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

The results are reported as mean ± standard deviation.

Different small Latin letters in each column indicate significant differences (P<0.05).

Different capital letters in each row indicate significant differences (P<0.05).

## ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی

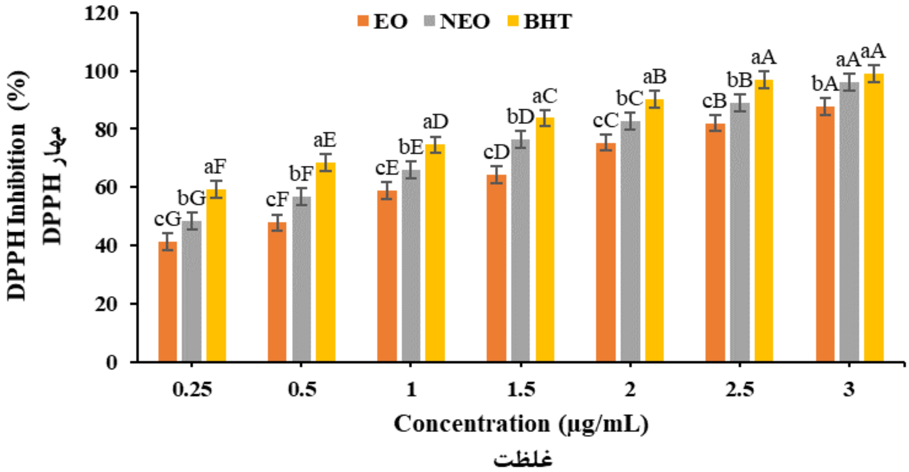
### فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو با سنجش DPPH در شکل ۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. با افزایش اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. فعالیت مهار رادیکال DPPH اسانس برگ بو کمتر از DPPH نانوامولسیون اسانس برگ بو بوده و سپس کمتر از نمونه شاهد (BHT) بوده است. وجود ترکیبات 1,8-Cineole و α- Terpinyl acetate درون اسانس خاصیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد (Maghsoodlou *et al*., 2015).

### سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی کاهش دهنده آهن (FRAP)

بطور گسترده گزارش شده است که ارتباط نزدیکی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت کاهش آهن وجود دارد. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. پس از امولسیون‌سازی، قدرت احیای آهن اسانس به وضوح افزایش یافت. بیشترین مقدار سنجش FRAP اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو در غلظت ۵ (µmol g$^{-1}$) و کمترین آن در غلظت ۰/۲۵ (µmol g$^{-1}$) مشاهده شد. نتایج کاهش فعالیت غلظت‌های مختلف اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو نشان داد که با افزایش غلظت اسانس، فعالیت FRAP افزایش می‌یابد. داده‌های حاصل از سنجش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نشان داد که اسانس و نانوامولسیون در مقایسه با Butylated hydroxytoluene

توانایی کمتری داشتند، اما کاملاً نانوامولسیون اثر ضد رادیکال و آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به اسانس آزاد داشت. استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در قالب نانوساختارهای غذایی، اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن‌ها را بهبود می‌بخشد و طیف وسیعی از نگهدارنده‌های طبیعی را به غذا ارائه می‌دهد (Tometri *et al.*, 2020؛ Sagar *et al.*, 2020؛ Hossain *et al.*, 2018).

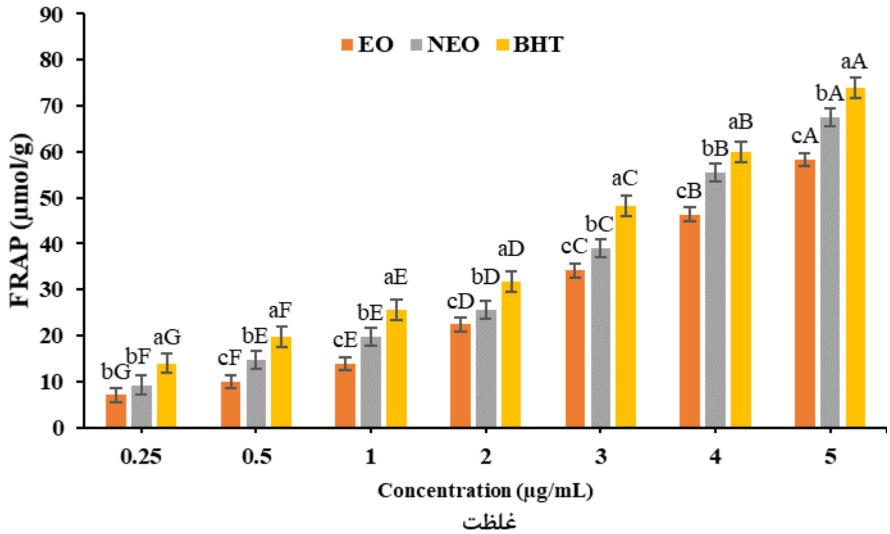



**شکل ۲- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو**

**Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity of Bay leaf essential oil and nanoemulsion**

حروف کوچک لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین نمونه‌های مختلف در هر غلظت است. حروف بزرگ لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین هر نمونه در غلظت‌های متفاوت است.

Different small Latin letters indicate significant differences (P<0.05) between different samples in each concentration. Different Latin capital letters indicate significant differences (P<0.05) between each sample at different concentrations.




**شکل ۳- سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی کاهش دهنده آهن**

**Fig. 3. Measuring the antioxidant power of reducing iron**

حروف کوچک لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین نمونه‌های مختلف در هر غلظت است. حروف بزرگ لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین هر نمونه در غلظت‌های متفاوت است.

Different small Latin letters indicate significant differences (P<0.05) between different samples in each concentration. Different Latin capital letters indicate significant differences (P<0.05) between each sample at different concentrations.

## ارزیابی اثرات ضدمیکروبی فیلم

فعالیت ضدباکتریایی فیلم‌های تهیه شده حاوی غلظت‌های مختلف (۱/۵ و ۳٪) اسانس و نانوامولسیون اسانس در برابر چهار سویه باکتریایی پاتوژن انتخاب شده با ارزیابی قطر مناطق بازدارنده ارزیابی شد. از آنجایی‌که مهار رشد باکتری‌های *B. cereus*، *S. aureus*، *P. aeruginosa* و *E. coli* بسیار مهم است، استفاده از فیلم صمغ دانه مرو حاوی اسانس و نانوامولسیون اسانس برگ بو تأثیر مثبت بر روی باکتری‌های مورد مطالعه داشت (جدول ۴). با توجه به نتایج مشخص شد که فیلم صمغ دانه مرو به تنهایی هیچ اثر بازدارنده‌ای بر روی هر یک از این سویه‌ها ندارد. فیلم‌های تهیه شده از غلظت‌های متفاوت اسانس یا نانوامولسیون اسانس برگ بو بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشترین تأثیر و بر روی باکتری *E. coli* کمترین تأثیر را دارند. ولی با توجه به این آزمایش مناسب‌ترین فیلم، فیلم با ۳ ٪ نانوامولسیون اسانس برگ بو می‌باشد، زیرا بیشترین تأثیر را داشت. شریفی فر و همکاران (Sharififar *et al*., 2007) اثرات ضدباکتریایی فیلم‌های کربوکسی متیل سلولز حاوی اسانس آویشن شیرازی را علیه پنج باکتری بیماری‌زا از جمله *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند. آن‌ها اشاره کردند که اسانس آویشن شیرازی بر روی باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر از باکتری‌های گرم منفی است، که احتمالاً به‌دلیل نفوذ ناپذیری غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی به اجزای چربی دوست است. ترکیبات 1,8-Cineole و α- Terpinyl acetate به‌عنوان ترکیبات اصلی اسانس برگ بو مشخص شدند که مانع رشد میکروبی می‌شوند. وجود این ترکیبات درون فیلم صمغ دانه مرو می‌توانند با حمله به لایه دوگانه فسفولیپیدی آن و آسیب رساندن به سیستم‌های آنزیمی، غشای سلولی را مختل کنند (Maghsoodlou *et al*., 2015).

## ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی فیلم

### آزمون ABTS

در آزمون ABTS همانطور که از شکل ۴ مشخص است در دو غلظت ۱/۵ و ۳ ٪ یک رابطه مستقیم بین فیلم صمغ دانه مرو حاوی اسانس برگ بو و فیلم حاوی نانوامولسیون اسانس برگ بو و قدرت آن‌ها در مهار رادیکال ABTS وجود داشته، به‌طوری‌که در غلظت ۳ درصد، قدرت آنتی‌رادیکالی آن افزایش یافته است. همچنین نتایج نشان داد فیلم حاوی اسانس اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به نمونه شاهد (فیلم بدون اسانس) دارد اما میزان بازدارندگی فیلم حاوی اسانس نسبت به فیلم حاوی نانوامولسیون اسانس در هر دو غلظت به صورت ضعیف‌تر بوده است. در بررسی که توسط علیزاده آملی و همکاران (Alizadeh Amoli *et al*., 2021) انجام شد، نشان داد که در این آزمون درصد بازدارندگی اسانس تقریباً در تمام غلظت‌ها به‌طور قابل توجهی بالا بوده است. به‌علاوه یک اثر وابسته به غلظت دیده شد بدین مفهوم که با افزایش غلظت اسانس، خاصیت حذف رادیکال آزاد نیز بیشتر می‌شود.

### آزمون DPPH

فعالیت مهار رادیکال DPPH به‌طور قابل توجهی از ۱/۲ درصد برای فیلم شاهد به ۶۹/۵۴ درصد برای فیلم صمغ دانه مرو حاوی ۳ درصد نانوامولسیون اسانس برگ بو افزایش یافت (شکل ۵).

**جدول ٤- ارزیابی اثرات ضدمیکروبی فیلم**

**Table 4- Evaluation of the antimicrobial effects of the film**

| | ناحیه قطر بازدارندگی<br>Inhibition Diameter Zone (mm) | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Sample** | ***B. cereus*** | ***S. aureus*** | ***P. aeruginosa*** | ***E. coli*** |
| Control (SSG) | ND$^{e}$ | ND$^{e}$ | ND$^{e}$ | ND$^{e}$ |
| SSG -1.5%EO | 5.92±0.02$^{dA}$ | 6.33±0.04$^{dA}$ | 2.91±0.01$^{dB}$ | 2.01±0.02$^{dB}$ |
| SSG -3%EO | 7.81±0.02$^{cA}$ | 8.05±0.10$^{cA}$ | 5.44±0.01$^{cB}$ | 3.48±0.05$^{cC}$ |
| SSG -1.5%NEO | 19.25±0.13$^{bA}$ | 20.79±0.11$^{bA}$ | 12.31±0.09$^{bB}$ | 10.52±0.12$^{bC}$ |
| SSG -3%NEO | 24.11±0.09$^{aA}$ | 23.62±0.16$^{aA}$ | 17.10±0.13$^{aB}$ | 14.65±0.21$^{aC}$ |

ND: تشخیص داده نشد.

حروف لاتین کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

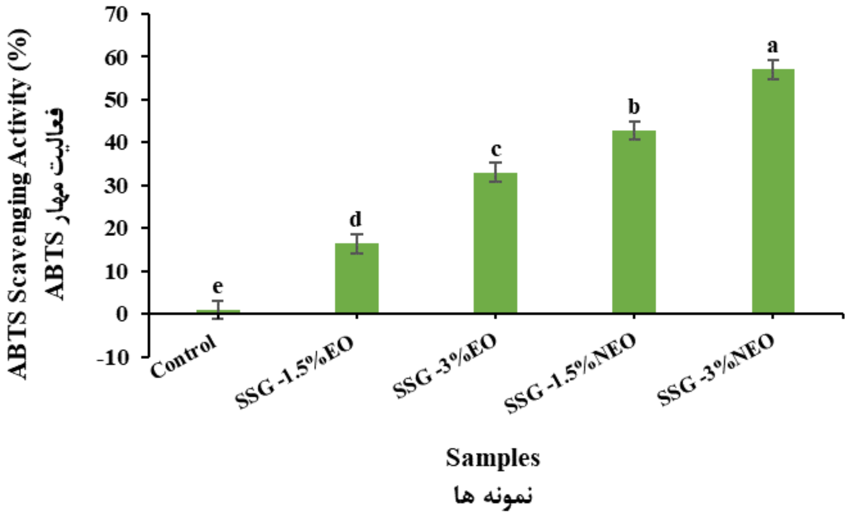
حروف لاتین بزرگ متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

ND: Not detected.

Different small Latin letters in each column indicate significant differences (P<0.05).

Different capital Latin letters in each row indicate significant differences (P<0.05).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم صمغ دانه مرو حاوی ۳٪ نانوامولسیون برگ بو بیشترین تأثیر را نسبت به نمونه کنترل داشت. با توجه به شکل ۵ کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بجز نمونه شاهد مربوط به فیلم صمغ دانه مرو حاوی اسانس برگ بو بود. بنابراین وجود نانوامولسیون اسانس برگ بو در فیلم با هر میزان غلظت تأثیر بیشتر نسبت به اسانس برگ بو داشت. همچنین نوری و همکاران (Noori *et al.*, 2017) به بررسی کارایی ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی پوشش خوراکی مبتنی بر نانوامولسیون حاوی اسانس زنجبیل و تأثیر آن بر ایمنی و ویژگی‌های کیفی فیله سینه مرغ پرداختند. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت مهاری توسط محلول فیلم مبتنی بر نانوامولسیون اسانس زنجبیل با BHT ۳٪ بوده است. بعد از آن محلول فیلم مبتنی بر نانوامولسیون اسانس زنجبیل خالص بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت.

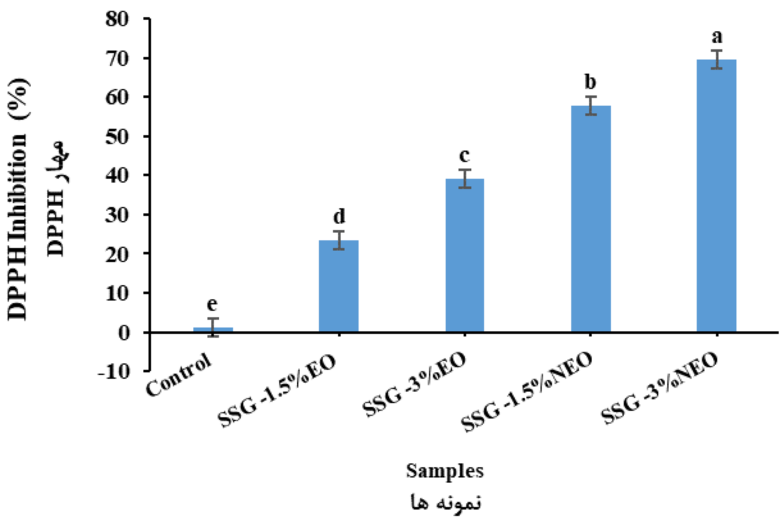



**شکل ٤- ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی فیلم**

**Fig. 4. Evaluation of antioxidant properties of the film**

حروف کوچک لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

Different lowercase Latin letters indicate significant differences (P<0.05).




**شکل ۵- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH فیلم**

**Fig. 5. DPPH free radical scavenging activity of the film**

حروف کوچک لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

Different lowercase Latin letters indicate a significant difference (P<0.05).

## نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فیلم صمغ دانه مرو حاوی ۳٪ نانوامولسیون اسانس به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار دارای بیشترین خاصیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی نسبت به فیلم حاوی اسانس برگ بو می‌باشد و مشخص شد که این فیلم پتانسیل استفاده به‌عنوان بسته‌بندی فعال یا پوشش فعال روی مواد غذایی را دارد. لیکن آزمایش‌های بیشتری برای تعیین اثرات آن‌ها بر خواص حسی محصولات بسته‌بندی شده و همچنین رفتار آن‌ها در مواد غذایی با محتوای رطوبت مختلف ضروری است.

## میزان مشارکت

حدیث تقواطلب: تحقیق و بررسی، مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، منابع، نرم‌افزار، نوشتن–پیش نویس اصلی

درنوش جعفرپور: تحلیل رسمی، مدیریت پروژه، نظارت، مدیریت داده‌ها، اعتبارسنجی، نوشتن– بررسی و ویرایش

## منابع تأمین مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی خاصی از بخش‌های عمومی، تجاری یا غیر انتفاعی دریافت نکرد.

## References


1. Alizadeh Amoli, Z., Mehdizadeh, T., & Tajik, H. (2021). Comparative investigation of antimicrobial and antioxidant properties of ethanolic extract and essential oil of water mint plant (*Mentha aquatic* L.). *Journal of Medical Sciences Studies*, *31*(11), 863-873. http://umj.umsu.ac.ir/article-1-4911-en.html
2. Amorati, R., Foti, M.C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(46), 10835-10847. https://doi.org/10.1021/jf403496k
3. Azizkhani, M., Jafari Kiasari, F., Tooryan, F., Shahavi, M.H., & Partovi, R. (2021). Preparation and evaluation of food-grade nanoemulsion of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) essential oil: antioxidant and antibacterial properties. *Journal of Food Science and Technology*, *58*, 1341-1348. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04645-6
4. Badr, M.M., Badawy, M.E., & Taktak, N.E. (2021). Characterization, antimicrobial activity, and antioxidant activity of the nanoemulsions of *Lavandula spica* essential oil and its main monoterpenes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *65*, 102732. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102732
5. Benzie, I.F., & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292
6. da Silva Dannenberg, G., Funck, G.D., dos Santos Cruxen, C.E., de Lima Marques, J., da Silva, W.P., & Fiorentini, Â.M. (2017). Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: Potential for application as active packaging for sliced cheese. *LWT-Food Science and Technology*, *81*, 314-318. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.002
7. Dzah, C.S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, *35*, 100547. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547
8. Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, *45*(2), 273-283. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011
9. Gholamhosseinpour, A., Hashemi, S.M.B., & Jafarpour, D. (2023). Nanoemulsion of *Satureja sahendica* bornm essential oil: Antibacterial and antioxidant activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *17*(1), 317-323. https://doi.org/10.1007/s11694-022-01615-8
10. Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Formulation and characterization of plant essential oil based nanoemulsion: evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Asian Journal of Chemistry*, *25* (Supplementary Issue), S321. http://www.asianjournalofchemistry.co.in/User/SearchArticle.aspx?Volume=25&Issue=10&Article=&Criteria=
11. Haghju, S., Beigzadeh, S., Almasi, H., & Hamishehkar, H. (2016). Chitosan films incorporated with nettle (*Urtica dioica* L.) extract-loaded nanoliposomes: I. Physicochemical characterisation and antimicrobial properties. *Journal of Microencapsulation*, *33*(5), 438-448. https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1208294
12. Hossain, M.B., Lebelle, J., Birsan, R., & Rai, D.K. (2018). Enrichment and assessment of the contributions of the major polyphenols to the total antioxidant activity of onion extracts: A fractionation by flash chromatography approach. *Antioxidants*, *7*(12), 175. https://doi.org/10.3390/antiox7120175
13. Jafarpour, D. (2022). The effect of heat treatment and thermosonication on the microbial and quality properties of green olive. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *16*(3), 2172-2180. https://doi.org/10.1007/s11694-022-01322-4
14. Jafarpour, D., Hashemi, S.M.B., & Ghaedi, A. (2021a). Study the antioxidant properties of different parts of saffron extract and their application in cream. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, *18*(113), 289-299. http://fsct.modares.ac.ir/article-7-43533-en.html

15. Jafarpour, D., Hashemi, S.M.B., & Ghaedi, A. (2021b). Investigating the antibacterial properties of the extract of different parts of Zagharan and its use in cream. *Iranian Journal of Food Science and Industry*, 115(18), 339-249. https://doi.org/10.52547/fsct.18.115.27
16. Jouki, M., Khazaei, N., Ghasemlou, M., & HadiNezhad, M. (2013). Effect of glycerol concentration on edible film production from cress seed carbohydrate gum. *Carbohydrate Polymers*, *96*(1), 39-46. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.077
17. Khodri, N., & Romiani, L. (2019). Evaluation of the effects of Shirazi thyme essential oil nanoemulsion on the chemical, microbial and sensory characteristics of silver carp fillet. *Journal of Nutritional Sciences and Food Industries of Iran*, *3*(14), 63-74. http://nsft.sbmu.ac.ir/article-1-2647-en.html
18. Lou, Z., Chen, J., Yu, F., Wang, H., Kou, X., Ma, C., & Zhu, S. (2017). The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. sarcodactylis and its nanoemulsion. *LWT*, *80*, 371-377. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.037
19. Maghsoodlou, M.T., Valizadeh, J., Mottaghipisheh, J., & Rahneshan, N. (2015). Evaluation of the essential oil composition and antioxidant activity of *Achillea eriophora* as a medicinal plant. *Journal of Medicinal Herbs*, *5*(4), 187-192. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i0.51210
20. Mirzai, S.M., & Mohammadi Sani, A. (2017). The effect of the use of myrtle gum on improving the physicochemical and sensory properties of low-fat ice cream. *Innovation in Food Science and Technology*, *9*(3), 97-103. https://doi.org/10.21608/jfds.2020.106364
21. Mohammadi, M., Yekta, R., Hosseini, H., Shahraz, F., Hosseini, S.M., Shojaee-Aliabadi, S., & Mohammadi, A. (2023). Characterization of a novel antimicrobial film based on sage seed gum and *Zataria multiflora* Boiss essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *17*(1), 167-177. https://doi.org/10.1007/s11694-022-01509-9
22. Mu, C., Guo, J., Li, X., Lin, W., & Li, D. (2012). Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. *Food Hydrocolloids*, *27*(1), 22-29. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.09.005
23. Naderi Hagibaghercandi, M., Sefidkon, F., Poorherave, M.R., & Mirza, M. (2009). Extraction, identification and comparison of the constituent compounds of the essential oil of the leaf, stem and fruit of Bay leaf (*Laurus nobilis* L.). *Scientific-Research Quarterly Journal of Medicinal and Aromatic Plants of Iran*, *25*(2), 216-227.
24. Noori, S., Zeynali, F., & Almasi, H. (2018). Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. *Food control*, *84*, 312-320. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.015
25. Qian, C., & McClements, D.J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, *25*(5), 1000-1008. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.017
26. Sagar, N.A., Pareek, S., & Gonzalez-Aguilar, G.A. (2020). Quantification of flavonoids, total phenols and antioxidant properties of onion skin: A comparative study of fifteen Indian cultivars. *Journal of Food Science and Technology*, *57*, 2423-2432. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04277-w
27. Sajjadi, S.A., Sarhadi, H., & Safarzaei, A. (2020). Physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of an active film based on chitosan and Barijah essential oil, *Innovation in Food Science and Technology*, *15*(1), 61-76. https://doi.org/10.30495/JFST.2021.685706
28. Severino, R., Ferrari, G., Vu, K.D., Donsì, F., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2015). Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium* on green beans. *Food Control*, *50*, 215-222. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.029
29. Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M., & Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, *18*(7), 800-805. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.04.002
30. Stubenrauch, K., Wessels, U., Vogel, R., & Schleypen, J. (2009). Evaluation of a biosensor immunoassay for simultaneous characterization of isotype and binding region of human anti-tocilizumab antibodies with control by surrogate standards. *Analytical Biochemistry*, *390*(2), 189-196. https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.04.021
31. Tometri, S.S., Ahmady, M., Ariaii, P., & Soltani, M.S. (2020). Extraction and encapsulation of *Laurus nobilis* leaf extract with nano-liposome and its effect on oxidative, microbial, bacterial and sensory properties of minced beef. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *14*, 3333-3344. https://doi.org/10.1007/s11694-020-00578-y
32. Wongnimitkul, N., Auiha, B., Rurkruthairat, P., & Borompichaichartkul, C. (2009). *Production of Konjac Glucomannan antimicrobial film for extending shelf life of fresh cut tomato.* In Southeast Asia Symposium on Quality and Safety of Fresh and Fresh-Cut Produce, 875 (pp. 251-256). https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.875.31